

Введение

Наиболее значимым из всех метаболических заболеваний является сахарный диабет второго типа (СД2). Отсутствующая или неадекватная сахароснижающая терапия в сочетании с нарушением режима питания и другими факторами ведёт к развитию гипергликемического состояния, при котором уровень глюкозы в крови может достигать 10-12 мМ. Хроническая гипергликемия приводит к развитию таких грозных осложнений, как диабетическая ретинопатия, нефропатия, синдром диабетической стопы, что увеличивает смертность и инвалидизацию пациентов. Клеточная составляющая иммунного ответа в наибольшей степени обусловлена нейтрофилами периферической крови, обеспечивающими врождённый иммунитет, реализующий множество защитных и сигнальных функций в организме. Нейтрофилы мигрируют в очаг воспаления, где активируются, высвобождая путем дегрануляции или нетоза содержимое цитоплазматических гранул, в результате чего во внеклеточную среду попадают различные биологически активные молекулы, в частности миелопероксидаза (МПО). МПО катализирует образование реакционных активных форм галогенов (АФГ), выполняющих бактерицидную функцию, но их чрезмерная продукция приводит к повреждению молекул, клеток и тканей организма, что вызывает формирование галогенирующего стресса [1]. Последний является причиной развития сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний. В этой связи актуальным является поиск средств и подходов, позволяющих регулировать уровень МПО в крови и препятствовать развитию галогенирующего стресса. На эту роль может претендовать белок острой фазы воспаления лактоферрин (ЛФ), широко распространённый во всех секретах жидкостях организма, а также локализованный в специфических гранулах нейтрофилов и проявляющий иммуномодулирующую, антимикробную, антиокислительную и другие биологически важные функции [2].

Иванов В.А.¹, Галкина Н.В.², Максимов Д.И.³, Горбунов Н.П.⁴, Костевич В.А.^{1,4}, Соколов А.В.^{1,4}, Островский Е.М.³, Гусев С.А.¹, Панасенко О.М.¹

¹Лаборатория физико-химических методов исследования и анализа ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

²Центр диабетической стопы ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

³Центр гнойной хирургии и регенеративных технологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

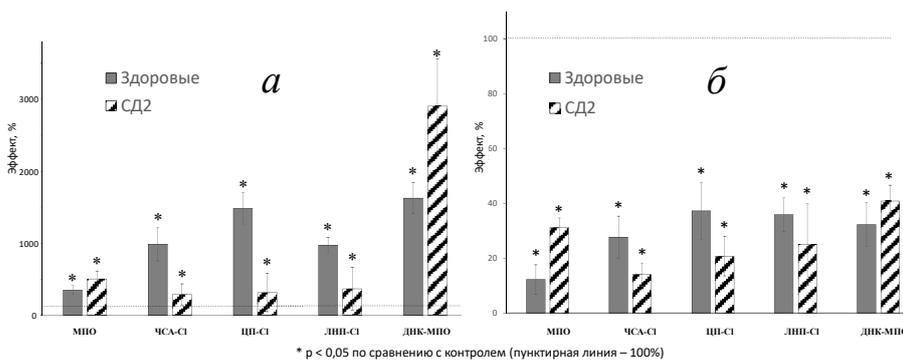
⁴Отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия

Ivanov@RCPCM.org Тел.: +7(926)666-13-40

Цель

Изучение влияния лактоферрина на содержание в крови здоровых доноров и больных сахарным диабетом 2 типа миелопероксидазы, маркеров галогенирующего стресса и нетоза при индуцированной активации нейтрофилов в экспериментах *ex vivo*.

Результаты



Результаты ИФА приведены на рисунке. Видно, что добавление в кровь активатора нейтрофилов – ФМА приводило к значительному возрастанию уровня МПО, маркеров галогенирующего стресса (ЧСА-С1, ЦП-С1, ЛНП-С1) и нетоза (ДНК-МПО) как у здоровых доноров, так и у больных СД2 (рис. а). Преинкубация крови с ЛФ (1 мг/мл) достоверно снижала все измеряемые параметры на 40-90% по сравнению с контролем (рис. б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛФ способен снижать секрецию нейтрофилами МПО, препятствовать нетозу и галогенирующему стрессу, воздействуя на активированные нейтрофилы.

Наши результаты хорошо согласуются с данными работы [4], где было показано, что ЛФ способен транслицироваться в мембрану, затрудняя выход из клетки нейтрофильных внеклеточных ловушек, в состав которых входит МПО. Это должно способствовать уменьшению концентрации фермента в плазме и, как следствие, снижению маркеров галогенирующего стресса. Падение уровня ЛНП-С1 в крови можно объяснить способностью ЛФ конкурировать с МПО за связывание с поверхностью ЛНП. Вытесняя функционирующую МПО из комплекса ЛНП-МПО, ЛФ препятствует модификации ЛНП под действием АФГ, образующихся при МПО-катализе [5].

Ранее в работе [6] показана возможность ЛФ праймировать и активировать нейтрофилы, способствуя их дегрануляции, что, казалось бы, противоречит нашим результатам. Однако надо иметь в виду, что авторы работы [6], в отличие от нас, проводили эксперименты на изолированных нейтрофилах. Известно, что ЛФ образует комплексы с белками плазмы, что может существенно изменить характер взаимодействия этого белка с поверхностью нейтрофилов, а также экранировать его доступность для рецепторов на клеточной мембране.

Материалы и методы

В исследовании участвовало 15 человек обоего пола, в возрасте от 45 до 86 лет, среди которых было 8 здоровых доноров и 7 пациентов, страдающих СД2 со стойкой гипергликемией (уровень глюкозы в крови превышал 7 мМ, уровень гликированного гемоглобина 7-9%). Забор венозной крови производили в вакуумные пробирки с ЭДТА. ЛФ добавляли в кровь до концентрации 1 мг/мл и инкубировали 2 часа при 37°C, после чего нейтрофилы активировали добавлением форбол-12-миристин-13-ацетата (ФМА, 0,16 мкМ) в ДМСО, инкубировали еще 0,5 часа. В контрольные образцы вместо ФМА добавляли тот же объем ДМСО. Далее в плазме методом ИФА определяли содержание МПО, маркеров галогенирующего стресса: хлорированных альбумина (ЧСА-С1), церулоплазмينا (ЦП-С1), липопротеинов низкой плотности (ЛНП-С1), а также комплекса ДНК-МПО – маркера нетоза [3].

Диабетическая стопа



Гнойно-некротическая рана стопы, ампутация второго пальца, как последствие развития диабетической стопы. Мужчина, 55 лет. Уровень сахара в крови 6-11 мМ. Гликированный гемоглобин – 8,3%.

Выводы

Полученные результаты расширяют возможность использования ЛФ в качестве основы для создания новых средств и подходов, направленных на регуляцию и коррекцию функции нейтрофилов и МПО с целью предотвращения галогенирующего стресса, что должно иметь положительный эффект при заживлении ран и течении хронических воспалительных заболеваний. Особенно перспективным выглядит данное направление ввиду того, что ЛФ является эндогенным белком организма человека, имеет низкую токсичность, активно применяется в медицинской практике для борьбы с госпитальными инфекциями и в качестве иммуномодулятора в составе комплексной терапии интоксикаций различного происхождения.

Список литературы

1. Panasenko O.M. The role of halogenative stress in atherogenic modification of low-density lipoproteins / O.M. Panasenko, T.I. Torkhovskaya, I.V. Gorudko, A.V. Sokolov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2020. – Vol. 85. Suppl. 1. – P. S34-S55.
2. Терехова М.С. Железосвязывающая способность лактоферрина при воспалении / М.С. Терехова, И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, И.В. Семак, А.В. Соколов, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // *Докл. БГУИР*. – 2018. – №7(117). – С. 80-84.
3. Соколов А.В. Связь между активной миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.В. Соколов, В.А. Костевич, Н.П. Горбунов, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко // *Медицинская иммунология*. – 2018. – Т. 20. – С. 699-710.
4. Okubo K. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation / K. Okubo, M. Kamiya, Y. Urano et al. // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 10. – P. 204-215.
5. Vasilyev V.B. Binding of lactoferrin to the surface of low-density lipoproteins modified by myeloperoxidase prevents intracellular cholesterol accumulation by human blood monocytes / V.B. Vasilyev, A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, A.Y. Elizarova, N.P. Gorbunov, O.M. Panasenko // *Biochem. Cell. Biol.* – 2021. – Vol. 99. – P. 109-116.
6. Grigorieva D.V. Effects of recombinant human lactoferrin on calcium signaling and functional responses of human neutrophils / D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, E.V. Shamova, M.S. Terekhova, E.V. Maliushkova, I.V. Semak, S.N. Cherenkevich, A.V. Sokolov, A.V. Timoshenko // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2019. – Vol. 675: 108122.